

RO/KR 13.01.2005



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

BEST AVAILABLE COPY

출원번호 : 10-2003-0080299
Application Number

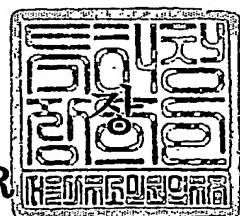
출원년월일 : 2003년 11월 13일
Date of Application NOV 13, 2003

출원인 : 한미약품 주식회사
Applicant(s) HANMI PHARM. IND. CO., LTD.

2005년 01월 05일



특허청
COMMISSIONER



【서지사항】

| | |
|------------|--|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【제출일자】 | 2003.11.13 |
| 【발명의 명칭】 | 면역글로불린 단편을 이용한 단백질 결합체 및 그의 제조방법 |
| 【발명의 영문명칭】 | PROTEIN CONJUGATE USING AN IMMUNOGLOBULIN FRAGMENT AND MEHTOD FOR THE PREPARTION THEREOF |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 한미약품 주식회사 |
| 【출원인코드】 | 1-1998-004411-2 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이현실 |
| 【대리인코드】 | 9-1999-000366-5 |
| 【포괄위임등록번호】 | 1999-056327-8 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 장성구 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000514-8 |
| 【포괄위임등록번호】 | 1999-023919-6 |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 김영민 |
| 【성명의 영문표기】 | KIM, Young Min |
| 【주민등록번호】 | 690813-1148928 |
| 【우편번호】 | 449-900 |
| 【주소】 | 경기도 용인시 기흥읍 고매리 877 매화마을 우남드림밸리 102동 803 호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 배성민 |
| 【성명의 영문표기】 | BAE, Sung Min |
| 【주민등록번호】 | 730529-1156311 |
| 【우편번호】 | 151-054 |
| 【주소】 | 서울특별시 관악구 봉천4동 1587-8 303호 |
| 【국적】 | KR |

【발명자】

【성명의 국문표기】 김대진
【성명의 영문표기】 KIM,Dae Jin
【주민등록번호】 741128-1066712
【우편번호】 137-049
【주소】 서울특별시 서초구 반포본동 구반포아파트 28동 402호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 양근희
【성명의 영문표기】 YANG,Geun Hee
【주민등록번호】 760113-2482011
【우편번호】 151-060
【주소】 서울특별시 관악구 봉천10동 50-148 101호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박영진
【성명의 영문표기】 PARK,Young Jin
【주민등록번호】 760905-1347940
【우편번호】 449-846
【주소】 경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 1137-6 101호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 권세창
【성명의 영문표기】 KWON,Se Chang
【주민등록번호】 630620-1024818
【우편번호】 143-210
【주소】 서울특별시 광진구 광장동 현대8차 802동 2205호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이관순
【성명의 영문표기】 LEE,Gwan Sun
【주민등록번호】 600110-1471553

100-30080299

출력 일자: 2005/1/7

| | | | |
|----------|---|---|-------------|
| 【우편번호】 | 138-130 | | |
| 【주소】 | 서울특별시 송파구 오금동 우창아파트 3동 404호 | | |
| 【국적】 | KR | | |
| 【심사청구】 | 청구 | | |
| 【취지】 | 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이현실 (인) 대리인 장성구 (인) | | |
| 【수수료】 | | | |
| 【기본출원료】 | 20 | 면 | 29,000 원 |
| 【가산출원료】 | 43 | 면 | 43,000 원 |
| 【우선권주장료】 | 0 | 건 | 0 원 |
| 【심사청구료】 | 37 | 항 | 1,293,000 원 |
| 【합계】 | 1,365,000 원 | | |
| 【첨부서류】 | 1. 요약서·명세서(도면)_1통 | | |

【요약서】**【요약】**

본 발명은 생체내 안정성이 향상된 단백질 결합체에 관한 것으로, 구체적으로 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 있어 상기 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 안정성이 향상된 단백질 결합체 및 그 이용에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 결합체는 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 활성이 비교적 높게 유지되고, 혈중 반감기가 현저히 증가되며, 면역반응 유발의 위험이 적어 다양한 폴리펩타이드 약물의 지속형 제제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 6

【명세서】**【발명의 명칭】**

면역글로불린 단편을 이용한 단백질 결합체 및 그의 제조방법 {PROTEIN CONJUGATE USING AN IMMUNOGLOBULIN FRAGMENT AND MEHTOD FOR THE PREPARTION THEREOF}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 면역글로불린을 파파인으로 절단하여 얻은 면역글로불린 Fc 영역을 정제한 크로마토그래피 결과이고,

도 2는 정제된 면역글로불린 Fc 영역을 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이고,

레인 1: 분자량 크기 마커,

레인 2: IgG

레인 3: IgG Fc 영역

도 3은 본 발명에 따라 융합반응 후 생성된 IFN α -PEG-IgG Fc (A), $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체-PEG-IgG Fc (B) 및 EPO-PEG-IgG Fc (C) 결합체를 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이고,

레인 M: 분자량 크기 마커,

레인 1: IgG Fc 영역,

레인 2: IFN α (A), $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체 (B) 및 EPO (C)

레인 3: IFN α -PEG-IgG Fc (A), $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체-PEG-IgG Fc (B) 및 EPO-PEG-IgG Fc (C)

도 4는 본 발명에 따라 융합반응 후 생성된 IFN α -PEG-IgG Fc 결합체의 크로마토그래피 결과이고,

도 5는 본 발명에 따라 제조된 EPO-PEG-IgG Fc 결합체의 질량 분석 결과이고,

도 6은 본 발명에 따라 제조된 IFN α -PEG-IgG Fc 결합체가 천연형 인터페론 알파에 비하여 우수한 혈중 안정성을 나타냄을 보여주는 약물동력학 그래프이고,

도 7은 본 발명에 따라 제조된 EPO-PEG-IgG Fc 결합체가 천연형 EPO 및 고 당쇄화 EPO에 비하여 증가된 혈중 반감기를 나타내는 것을 보여주는 약물동력학 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<13> 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 생리활성 지속기간이 천연형에 비해 연장된 단백질 결합체 및 그 이용에 관한 것이다.

<14> 폴리펩타이드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 신장이나 간을 통해 쉽게 제거되기 때문에, 약리성분으로 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 의약품의 혈중 농도 및 역ガ를 유지하기 위해서는 단백질 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나, 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되는 단백질 의약품의 경우, 활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사를 놓는 것은 환자에게 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 단백질 약물의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔다.

이러한 단백질 약물의 지속성 제제는 단백질 약물의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역가가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다.

<15> 단백질을 안정화시키고 단백질 가수분해효소와의 접촉 및 신장 소설을 억제하기 위한 방법으로, 종래에는 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol: 이하 "PEG"라 약칭함)과 같이 용해도가 높은 고분자를 단백질 약물 표면에 화학적으로 부가시키는 방법이 사용되어 왔다. PEG는 목적 단백질의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 용해도를 높임으로써 단백질을 안정화시키고, 단백질의 가수분해를 방지하는데 효과가 있으며 특별한 부작용도 일으키지 않는 것으로 알려져 있다 (Sada et al., *J. Fermentation Bioengineering* 71: 137-139, 1991). 그러나, PEG를 결합시키는 경우에 단백질의 안정성은 증가할 수 있지만 생리활성 단백질의 역자가 현저히 낮아지고, PEG의 분자량이 증가할수록 단백질과의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있다.

<16> 최근에는, PEG의 양쪽 말단에 동일한 단백질 약물을 결합시킨 이중체를 만들어 활성 증가를 꾀하거나 (미국특허 제5,738,846호), 서로 다른 종류의 단백질 약물을 PEG의 양쪽 말단에 결합시켜 동시에 2가지 활성을 나타내는 단백질 (국제출원공개 WO 92/16221)도 개발되었지만, 이들은 단백질 약물의 활성을 지속시키는 면에서는 뚜렷한 효과를 보이지 못하였다.

<17> 한편, 키스틀러 등은 과립구 콜로니 자극인자 (G-CSF)와 인간 알부민을 PEG에 결합시킨 융합단백질이 증가된 안정성을 보인다고 보고하였다 (Kinstler et al., *Pharmaceutical Research* 12(12): 1883-1888, 1995). 그러나, G-CSF-PEG-알부민 구조를 갖는 상기 문헌의 변형된 약물은 체내 잔류시간이 천연형 약물을 단독 투여한 경우에 비해 약 4배 증가하는데 불과하고, 혈중 반감기 증가가 미미하여 단백질 약물의 효과적인 지속성 제제로서 실용화되지 못하고 있다.

<18> 생리활성 단백질의 생체내 안정성을 높이는 또 다른 방법으로서, 유전자 재조합에 의해 혈중 안정성이 높은 단백질 유전자와 생리활성 단백질 유전자를 연결한 후, 상기 재조합 유전자로 형질전환된 동물세포 등을 배양하여 융합단백질을 생산하는 방법이 개발되어 있다. 예를 들면, 현재까지 단백질의 안정성 증가에 가장 효과가 높은 것으로 알려져 있는 알부민 또는 그 단편을 유전자 재조합에 의해 목적하는 생리활성 단백질에 결합시켜 생산한 융합단백질이 보고되어 있다 (국제출원공개 WO 93/15199 및 WO 93/15200, 유럽특허공개 EP 413,622). 휴먼 게놈 사이언스 (Human Genome Science)사가 효모에서 생산한 인터페론 알파와 알부민의 융합단백질 (제품명: AlbuferonTM)은 원숭이에서 인터페론의 반감기를 5시간에서 93시간으로 증가시켰지만, 변형되지 않은 인터페론에 비해 생체 활성도가 5% 미만으로 현저히 감소하는 문제가 있다 (Osborn et al., *J. Phar. Exp. Ther.* 303(2) 540-548, 2002).

<19> 한편, 면역글로불린 (immunoglobulin, Ig)을 이용한 융합단백질로서, 인터페론 (대한민국 특허공개 제2003-9464호) 또는 인터루킨-4 수용체, 인터루킨-7 수용체, 적혈구 생성인자 수용체 (대한민국 특허등록 제249572호)를 면역글로불린의 중쇄 불변영역 이랑체 (Fc)와 융합된 형태로 포유동물에서 발현시키는 것이 알려져 있으며, 국제특허공개 WO 01/03737에는 사이토카인 또는 성장인자를 올리고펩타이드 링커 (linker)를 통해 면역글로불린의 단편에 결합시킨 융합단백질이 개시되어 있다. 그러나, 유전자 재조합에 의한 융합단백질 생산방법은 융합 파트너로 사용될 수 있는 면역글로불린의 분자량이 제한적이고, 적합한 발현 시스템 확립이 어려울 뿐만 아니라, 생산된 융합단백질에서 나타나는 당쇄화 양상이 천연형 폴리펩타이드 약물과는 상이할 수 있고, 융합부위에 새롭게 형성된 단백질 서열이 면역반응을 유발할 가능성을 갖는 등의 문제점을 갖고 있다.

<20> 면역글로불린은 크게 항원 결합부위를 가진 Fab 영역과 보체 결합영역을 가진 Fc 영역으로 구분되는데, 미국특허 제5,116,964호는 면역글로불린의 중쇄 불변영역 (Fc)의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 유전자 재조합 방법에 의해 융합된 단백질을 개시하고 있고, 미국특허 제5,349,053호는 IL-2를 면역글로불린 Fc 영역에 융합시킨 융합단백질의 개발을 시도한 바 있다. 그 외에도, 인터페론-베타 및 그의 유도체를 면역글로불린 Fc 영역에 융합시킨 국제특허 공개 WO 00/23472, IL-5 수용체를 융합시킨 미국특허 제5,712,121호, 인테페론 알파를 면역글로불린 G4의 Fc 영역에 융합시킨 미국특허 제5,723,125호 및 CD4 단백질을 면역글로불린 G2의 Fc 영역에 융합시킨 미국특허 제6,451,313호에 유전자 재조합에 의한 Fc 융합단백질의 개발이 예시되어 있다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산을 변형시킨 미국특허 제5,605,690호에서는 면역글로불린 Fc 영역에서 특히 보체 결합부위나 수용체 결합부위의 아미노산을 변형시킨 Fc를 이용하여 유전자 재조합 방법에 의한 TNFR-IgG1 Fc 융합단백질의 개발을 교시하고 있고, 이와 같이 변형된 면역글로불린의 Fc 영역을 이용한 유전자 재조합 방식의 융합단백질의 개발은 미국특허 제6,277,375호, 제6,410,008호 및 제6,444,792호에도 개시되어 있다.

<21> 그러나, 이러한 Fc 융합단백질의 개발은 두 종류의 단백질 연결부위가 면역글로불린 Fc 영역의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에만 융합이 가능하고, 융합에 의해 새로 생긴 아미노산 서열로 인하여 항원성이 유발될 수 있을 뿐만 아니라 링커 부위에 대한 단백질 가수분해효소의 민감성이 증가될 수 있다. 뿐만 아니라, 면역글로불린 Fc 영역을 이용한 융합단백질의 개발에 유전자 재조합 방법을 이용하지 않고 천연형 인체 유래 Fc를 사용하여 교차결합제로 단백질과의 결합체를 얻고자 하는 시도는 아직까지 이루어지지 않고 있다.

<22> 이처럼 생리활성 단백질에 고분자를 결합시키는 다양한 방법이 시도되어 왔지만, 기존의 방법들은 폴리펩타이드의 안정성을 높이면 활성이 현저히 감소하거나, 안정성과는 무관하게

활성만을 증가시키는 것이어서, 변형에 의한 단백질 약물의 활성 감소를 최소화하고 안정성 향상을 동시에 달성하는 방법의 개발이 여전히 요구되고 있는 실정이다.

<23> 이에, 본 발명자들은 종래에는 동시에 달성하기 어려운 것으로 여겨져 왔던 활성 감소 최소화와 안정성 증가를 동시에 이를 수 있는 지속성 단백질 약물 제제를 개발하기 위해 연구를 계속한 결과, 면역글로불린 Fc 영역, 비펩타이드성 중합체 및 생리활성 폴리펩타이드를 상호 공유결합에 의해 연결시켜 제조한 단백질 결합체가 생리활성 단백질의 혈중 반감기를 획기적으로 증가시키고, 공지의 단백질 약물에 비해 높은 역가를 유지함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<24> 본 발명의 목적은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 생리활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기를 증가시키고 생리활성을 개선시키면서도 면역반응 유발의 위험이 없는 단백질 결합체를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<25> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 있으며, 상기 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 안정성이 증가된 단백질 결합체를 제공한다.

<26> 또한, 본 발명은 (a) 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체, 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역을 반응시켜 이들을 상호 공유결합에 의해 연결하는 단계; 및

(b) 비펩타이드성 중합체의 양 말단에 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 각각 공유결합에 의해 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 생체내 지속성이 증가된 단백질 결합체의 제조방법을 제공한다.

<27> 아울러, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결된 단백질 결합체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 지속성 단백질 약물 제제를 제공한다.

<28> 마지막으로, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역을 상호 공유결합에 의해 연결시키는 것을 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 지속성을 향상시키는 방법을 제공한다.

<29> 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<30> 본 발명에서 "생리활성 폴리펩타이드", "생리활성 단백질", "활성 단백질" 또는 "단백질 약물"이란 생체내에서 생리적 현상에 길항작용을 나타내는 폴리펩타이드 또는 단백질을 의미하는 용어로서 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

<31> 본 발명에서 "단백질 결합체" 또는 "결합체"라 함은 하나 이상의 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 하나 이상의 비펩타이드성 중합체 및 하나 이상의 면역글로불린 Fc 영역을 포함하고, 이를 구성요소가 공유결합으로 상호 연결되어 있는 것을 가리킨다. 또한, 3 가지 성분을 필수적으로 포함하는 본 발명의 상기 "결합체"와 구별하기 위하여 구성요소로 2 종류의 물질 분자만이 공유결합으로 연결된 구조물은 "연결체"로 표시한다.

<32> 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체"는 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 영역을 연결하는 링커로 작용하는데, 양 말단에 서로 같거나 다른 반응기를 포함한다. 또한, 상기 비펩타이드성 중합체는 서로 다른 종류의 비펩타이드성 중합체가 2개 이상 연속적으로 연결되어 하나의 비펩타이드성 중합체로 작용할 수 있다.

<33> 본 발명에서 "면역글로불린 Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1 (C_H1)과 경쇄 불변영역 1 (C_L1)을 제외한 나머지 부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지 (hinge) 부분을 포함하기도 한다.

<34> 본 발명의 다른 측면으로서, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결시키는 것을 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 지속성을 향상시키는 방법을 제공한다.

<35> 상기 생리활성 폴리펩타이드의 지속성 향상은 본 발명의 정의에 따른 단백질 결합체를 형성함으로써 달성된다.

<36> 상기에서, 본 발명의 단백질 결합체는 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기가 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역과 공유결합으로 연결된 [생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체-면역글로불린 Fc 영역]의 조합을 하나 이상 포함한다. 즉, 하나의 면역글로불린 Fc 영역에 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 비펩타이드성 중합체의 연결체 하나 이상이 공유결합으로 연결됨으로써, 면역글로불린 Fc 영역을 매개체로 하여 생리활성 폴리펩타이드 단량체, 이량체 혹은 다량체를 형성할 수 있으며, 이를 통해 생체내 활성 및 안정성 증가를 보다 효과적으로 달성할 수 있다. 본 발명의 단백질 결합체에 있어 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 영역은 1:1 내지 10:1, 바람직하게는 1:1 내지 4:1의 몰비로 결

합될 수 있다. 본 발명의 단백질 결합체에서는 같거나 다른 종류의 비펩타이드성 중합체가 2개 이상 연속적으로 연결되어 하나의 비펩타이드성 중합체로 작용할 수도 있다.

<37> 본 발명의 단백질 결합체에 있어, 면역글로불린 Fc 영역의 결합부위는 힌지부위 및 불변영역에 존재하는 아미노산 잔기의 유리 반응기 중 하나 이상을 포함하며, 특히 면역글로불린 Fc 불변영역의 아미노 말단, 라이신의 아미노 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 유리 시스테인 잔기가 비펩타이드성 중합체의 말단 반응기와 공유결합에 의해 연결되는 것이 바람직하다.

<38> 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 및 이들의 혼합물의 Fc 영역들로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, IgG의 경우 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 모든 아형(subtype)의 면역글로불린 Fc 영역이 이용될 수 있다. 본 발명의 단백질 결합체가 인간에게 적용되는 지속성 제제로 이용되기 위해서는 면역반응을 유발하지 않도록 상기 면역글로불린 Fc 영역이 인간 면역글로불린 Fc 영역인 것이 바람직하다.

<39> 본 발명의 단백질 결합체를 구성하는 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 혈액으로부터 얻은 면역글로불린을 단백질 가수분해효소로 절단한 후 정제한 천연형 단백질 또는 유전공학적으로 생산된 재조합 단백질 중 어느 것이나 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 단백질 결합체를 구성하는 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 목적과 관련된 기능, 구조 또는 안정성에 있어서 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 결합에 중요하다고 알려진 영역(예를 들면, IgG의 경우 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번째 아미노산 영역)을 포함할 수 있고, 이를 중 일부 아미노산 잔기가 다른 아미노산으로 치환되거나 고 당쇄화된 유도체 또는 일부 아미노산 서열이 추가되거나 결실된 것도 사용할 수 있다.

<40> 분자량이 매우 커 결합체의 제조, 정제 및 수율면에서 여러 가지 문제점이 야기될 수 있는 면역글로불린 전체 분자를 사용하는 대신 본 발명에서는 면역글로불린의 가변영역을 배제하고 상대적으로 분자량이 적은 Fc 영역만을 활용함으로써 물질의 동질성이 크게 증가되고, 혈중 항원성을 유발할 가능성이 면역글로불린 자체를 사용하는 것보다 낮아지는 효과를 기대할 수 있다.

<41> 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 말레이미드 (maleimide) 그룹 및 석시나미드 (succinamide) 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시나미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 하이드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하면서 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역의 아미노 말단과 각각 결합시키는 데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합을 갖는 동일한 중합체보다 훨씬 안정적이다.

<42> 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹 또는 뷰틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는, 공자의 화학반응에 의해 상기 하이드록시 반응기를 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 본 발명의 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

<43> 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 매개로 연결되는 경우에는, 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 생리활성

폴리펩타이드의 아미노 말단, 카르복실 말단, 라이신 잔기, 히스티딘 잔기 또는 시스테인 잔기 등의 반응기와 결합할 수 있다.

:44> 본 발명의 단백질 결합체의 구성성분으로서 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌글리콜 단독 중합체, 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르 등과 같은 수용성 중합체, 폴리락틱글리콜산 (PLGA, polylactic glycolic acid) 등과 같은 생분해성 고분자 중합체, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들이 둘 이상 연결되어 있는 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명에서 사용가능한 비펩타이드성 중합체의 분자량은 1 내지 100 kDa 범위인 것이 바람직하다.

:45> 종래 알려진 바와 같이 생리활성 폴리펩타이드와 리간드 단백질이 올리고펩타이드를 매개로 하여 연결되는 경우 그 연결부위에 의하여 새롭게 형성되는 단백질 서열이 면역반응을 유발시킬 위험이 있으며, 연결되는 단백질들의 결합 방향이 N-말단과 C-말단의 결합으로만 제한되었던 반면, 본 발명의 단백질 결합체는 생체적합성을 갖는 비펩타이드성 중합체에 의하여 매개되기 때문에 독성이나 면역반응 유발과 같은 부작용이 없고, 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 영역의 결합 방향성의 제한 없이 N-말단과 N-말단의 결합 등이 가능하므로 다양한 단백질 결합체를 제공할 수 있다.

:46> 또한, 종래 유전자 재조합에 의한 면역글로불린 Fc 영역과 활성 단백질의 직접적 융합방법은 융합 파트너로 사용될 수 있는 면역글로불린 Fc 영역의 말단 서열에서만 융합이 가능하고 동물세포 배양방법에 의해 그 생산량이 제한적일 뿐만 아니라 정확한 형태의 폴딩 (folding)

이 이루어져야 하고 동종이량체 (homo dimer)의 형태로 융합단백질이 생산되는데 반해, 본 발명의 단백질 결합체에서는 그러한 제한이 없어 보다 높은 지속성 및 안정성을 달성할 수 있으며, 세포 배양에 따른 활성 단백질의 천연형과 상이한 당쇄화 문제 등이 없으므로 폴리펩타이드의 활성 유지면에서도 바람직하다.

<47> 한편, 카보디이미드나 글루타르알데히드와 같은 저분자량의 화학적 결합제를 사용하는 경우에는 상기 화학적 결합제가 단백질의 여러 부위에 동시에 결합하여 단백질을 변성시키거나, 비특이적 결합으로 결합위치의 조절을 곤란하게 하거나, 결합된 단백질의 정제를 어렵게 하는 등의 문제점이 있다. 이에 반해, 본 발명의 단백질 결합체는 비펩타이드성 중합체를 사용하므로 결합부위의 조절이 용이하고, 비특이적 반응을 최소화하며, 정제가 용이한 장점을 갖는다.

<48> 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역을 이용한 단백질 결합체는 PEG만을 결합시킨 경우는 물론이고 알부민을 결합시킨 종래 기술에 비해서도 월등히 우수한 안정성 및 활성을 나타낸다. 본 발명의 단백질 결합체를 공지의 기술에 의한 것과 비교하였을 때, 인터페론 알파에 분자량 40 kDa의 PEG만을 결합시킨 경우에는 인터페론 알파의 혈중 반감기가 천연형에 비해 약 20배 증가하고, 인터페론 알파를 PEG를 이용하여 알부민과 결합시킨 경우에는 약 10배 증가한 반면, 인터페론 알파에 PEG를 이용하여 면역글로불린 Fc 영역을 결합시킨 경우에는 혈중 반감기가 약 40배 정도로 획기적으로 증가하였다 (표 2 참조). 인터페론 알파, 과립구 콜로니 자극인자 및 그 유도체와 적혈구 생성인자를 인간 성장호르몬 대신 실험한 결과도 마찬가지 결과를 나타내는데, PEG나 PEG-알부민을 결합시킨 경우에 비해 PEG-IgG Fc 영역을 결합시킨 본 발명의 단백질 결합체가 평균 체류시간 (mean residence time; MRT)의 현저한 증가를 보이는 것은 물론

이고, 활성 반감기도 공지기술에 비해 2 내지 70배 이상 획기적으로 증가하였다 (표 2 내지 표 6 참조).

:49> 즉, 기존의 단백질 혈중 지속성을 증가시키기 위한 PEG 제형 중 지속성이 가장 높은 40 kD PEG를 수식한 단백질과의 비교는 물론, PEG-알부민을 결합시킨 단백질과의 비교시험에서도 본 발명의 단백질 결합체가 탁월한 혈중 지속성 및 평균 체류시간을 나타내었다. 이와 같이, 본 발명의 단백질 결합체는 인간 성장호르몬, 인터페론, 콜로니 자극인자, 적혈구 생성인자 뿐만 아니라 돌연변이에 의한 콜로니 자극인자 유도체에 이르기까지 광범위한 범위의 생리활성 단백질에서 종래의 PEG 결합단백질 또는 알부민 결합단백질 보다 탁월한 혈중 안정성과 평균 체류시간을 나타내므로, 다양한 종류의 생리활성 폴리펩타이드의 지속형 제제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

:50> 또한, 본 발명의 단백질 결합체 및 이를 이용한 단백질의 생체내 안정성을 향상시키는 방법은 생체적합성을 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하기 때문에 단백질의 결합방향을 다양하게 할 수 있으며, 결합부위의 조절이 용이하고, 비특이적 반응을 최소화할 뿐만 아니라 인체 유래 면역글로불린 Fc 영역을 사용하여 독성이나 면역반응 유발과 같은 부작용이 없고 정제가 용이한 장점을 갖는다. 공지의 단백질 안정성 증가방법으로 안정성이 가장 높은 것으로 알려진 40 kD PEG를 단독 수식하는 방법 및 PEG-알부민을 결합시키는 방법과 비교하였을 때, 본 발명의 단백질 안정화 방법은 수배 내지 수십 배로 현저히 높은 혈중 안정성 및 평균 체류시간을 나타낸다. 뿐만 아니라, 상대적으로 고가인 40 kD PEG를 사용하는 대신 단가가 매우 낮은 저분자량의 PEG를 사용함으로써 경제적으로도 유리하다.

:51> 본 발명의 단백질 결합체 및 이를 이용하여 단백질의 생체내 안정성을 향상시키는 방법은 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체와 같은 다양한 생리활성 폴리펩타이드에 적용될 수 있다.

:52> 구체적으로, 상기 생리활성 폴리펩타이드는 인간 성장호르몬, 성장호르몬-방출 호르몬, 성장호르몬-방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극인자, 인터루킨, 마크로파지 활성인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 플라즈미노겐 활성인자, 유로키나제, 스트렙토ки나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장인자, 표피 성장인자, 오스테오제닉 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골유도인자, 결합조직 활성인자, 여포 자극호르몬, 황체 형성호르몬, 황체 형성호르몬-방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴액신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토카닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린-방출 펩타이드, 코티코트로핀-방출 인자, 갑상선 자극호르몬, 단일클론 항체, 폴리클론 항체, [Fab]', [Fab] '2, scFv와 같은 항체 유도체, 바이러스 유래 백신 항원 등 다양한 종류를 포함하며, 상기 폴리펩타이드의 천연형과 실질적으로 동등하거나 또는 증가된 기능, 활성 또는 안정성을 갖는 한, 일부 아미노산 잔기가 다른 아미노산으로 치환되거나 고 당쇄화된 유도체 또는 일부 아미노산 서열이 추가되거나 결실된 단편도 본 발명의 생리활성 폴리펩타이드의 범위에 포함된다. 본 발명의 단백질 결합체는, 질병의 치료 또는 예방의 목적으로 인체에 투여될 때 투여 빈도가 높은

인간 성장호르몬, 인테페론 알파, 과립구 콜로니 자극인자 또는 적혈구 생성인자 등에 특히 효과적으로 사용될 수 있다.

<53> 또한, 본 발명의 단백질 결합체 및 이를 이용한 단백질 안정화 방법은 소 성장호르몬 또는 돼지 성장호르몬과 같은 동물의 성장호르몬을 이용한 지속형 단백질 제제의 개발에도 사용될 수 있으며, 인터페론을 포함한 동물의 질병 치료나 예방을 위한 지속형 단백질 제제의 개발에도 사용될 수 있다.

<54> 본 발명의 다른 측면으로서, 본 발명은

<55> (a) 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체, 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역을 반응시켜 이들을 상호 공유결합에 의해 연결시키는 단계; 및

<56> (b) 비펩타이드성 중합체의 양 말단에 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 각각 공유결합에 의해 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 안정성이 증가된 단백질 결합체의 제조방법을 제공한다.

<57> 단계 (a)에서 상기 세 성분의 결합은 순차적으로 또는 동시에 일어날 수 있다. 예를 들어, 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단에 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역을 결합시키는 경우에는, 생리활성 폴리펩타이드와 면역글로불린 Fc 영역 중 어느 하나를 먼저 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단에 결합시킨 후, 나머지 성분을 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 결합시키는 방식으로 순차적으로 반응을 진행하는 것이 목적하는 단백질 결합체 외의 부산물 생성을 최소화하는데 유리하다.

<58> 단계 (a)는

<59> (a1) 활성화된 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나를 공유결합에 의해 연결시키는 단계;

<60> (a2) 상기 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체에 결합된 면역글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩타이드 연결체를 분리하는 단계; 및

<61> (a3) 상기에서 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드 중 비펩타이드성 중합체에 이미 결합되어 있지 않은 나머지 성분을 공유결합에 의해 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

<62> 상기 단계 (a1)에서, 반응물이 생리활성 폴리펩타이드인 경우에 상기 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체의 최적 반응 몰비는 1:2.5 내지 1:5 범위인 것이 바람직하고, 반응물이 면역글로불린 Fc 영역인 경우에 상기 면역글로불린 Fc 영역과 비펩타이드성 중합체의 최적 반응 몰비는 1:5 내지 1:10 범위인 것이 바람직하다.

<63> 한편, 단계 (a3)의 반응물질로서 단계 (a2)에서 수득된 연결체와 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드 중 연결체에 결합되어 있지 않은 나머지 성분과의 반응 몰비는 1:0.5 내지 1:20 범위일 수 있고, 1:1 내지 1:3 범위인 것이 바람직하다.

<64> 단계 (a1) 및 단계 (a3)의 반응은 반응에 참가하는 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단 반응기의 종류를 고려하여 필요에 따라 환원제의 존재 하에 수행될 수 있다. 바람직한 환원제로는 나트륨 시아노 보로하이드라이드 (NaCnBH_3), 수소화붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염 또는 피리딘 붕산염 등이 사용될 수 있다.

<65> 상기에서 단계 (a2) 또는 (b)는 생성된 산물의 분자량 및 전하량과 같은 특성을 고려하여 단백질의 분리에 사용되는 통상의 방법들 중에서 필요에 따라 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 단계 (a2)에서는 생성된 연결체 단백질의 크기를 고려하여 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피를 포함하는 다양한 공지의 방법들을 적용할 수 있으며, 필요에 따라서는 보다 높은 순도로 정제하기 위해 복수개의 서로 다른 방법을 조합하여 사용할 수 있다.

<66> 본 발명의 또 다른 측면으로서, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 면역글로불린 Fc 영역 및 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체가 상호 공유결합에 의해 연결된 단백질 결합체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 안정성이 증가된 향상된 단백질 약물 제제를 제공한다.

<67> 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 지속성 단백질 약물 제제는 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 정제, 알약, 분말, 새세이 (sachet), 엘릭서 (elixir), 혼탁액, 에멀젼, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다. 본 발명의 지속성 단백질 약물 제제는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을

포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다.

<68> 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결된 본 발명의 단백질 결합체는 종래의 혈중 지속성이 낮은 생리활성 폴리펩타이드 보다 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 줄일 수 있어 면역반응 유발 가능성도 낮을 것으로 기대 된다.

<69> 본 발명의 단백질 결합체의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 질환의 종종도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 생리활성 폴리펩타이드의 종류에 따라 결정된다. 즉, 단백질 결합체에 포함된 생리활성 폴리펩타이드의 종류에 따라 당업계에서 질병의 치료 및 예방에 통상 사용되는 투여량을 기준으로 하여 결정하되, 투여 간격은 본 발명의 단백질 결합체가 나타내는 지속효과를 고려하여 상당히 연장될 수 있다.

<70> 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀더 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<71> <실시예 1> 인터페론-PEG-면역글로불린 Fc 영역 결합체의 제조 I

<72> <단계 1> 면역글로불린을 이용한 면역글로불린 Fc 영역의 제조

<73> 면역글로불린 Fc 영역을 제조하기 위하여, 10 mM 인산염 완충용액에 용해된 분자량 150 kDa의 면역글로불린 G (Immunoglobulin G; IgG)(녹십자, 한국) 200 mg에 단백질 가수분해효소 파파인 (Papain, Sigma사, 미국)을 2 mg 처리하여 37°C에서 2시간 동안 천천히 교반하면서 반응을 진행시켰다. 효소반응 후 미반응 면역글로불린, 단백질 가수분해효소 파파인 및 부산물

을 제거하고 생성된 면역글로불린 Fc 영역을 정제하기 위하여 세파덱스 컬럼, 단백질 A 컬럼 및 양이온 교환수지 컬럼을 순차적으로 수행하였다. 구체적으로, 반응액을 인산나트륨 완충용액 (PBS, pH 7.3)으로 평형화시킨 슈퍼덱스 200 (Superdex 200, Pharmacia사) 컬럼에 점적하였으며, 동일한 완충용액을 이용하여 유속 1 mL/분으로 용출하였다. 면역글로불린 Fc 영역보다 분자량이 상대적으로 큰 미반응 면역글로불린 (IgG)과 $F(ab')_2$ 등은 앞쪽에서 용출되므로 이를 먼저 제거하였다. 면역글로불린 Fc 영역과 분자량이 유사한 Fab는 단백질 A 컬럼을 사용하여 제거하였다 (도 1). 20 mM 인산염 완충용액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 단백질 A (Pharmacia 사, 독일) 컬럼에 슈퍼덱스 200에서 정제된 용출분획을 5 mL/분의 유속으로 부하한 후 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 제거하기 위해 충분히 세척하였다. 여기에 100 mM 시트르산 나트륨 (Na citrate, pH 3.0) 완충용액을 흘려주어 순도가 높은 면역글로불린 Fc 영역을 용출하였다. 단백질 A 컬럼으로 정제된 Fc 분획을 마지막으로 양이온 교환수지 컬럼 (polyCAT, PolyLC Inc. 미국)을 사용하여 최종 정제하였는데, 10 mM 아세테이트 완충용액 (pH 4.5) 조건에서 직선 농도구배 (염화나트륨 농도 0.15 M → 0.4 M) 방법으로 흘려 고순도의 분획을 얻을 수 있었다 (도 2).

<74> <단계 2> 인터페론 알파와 PEG 연결체의 제조

<75> 양쪽 말단에 알데히드 반응기를 가진 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌글리콜인 ALD-PEG-ALD (Shearwater Inc. 미국)를 인간 인터페론 알파-2b (Interferon α -2b, IFN α -2b, 분자량 20 kDa)가 5 mg/mL 농도로 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 인간 인터페론 알파 : PEG의 몰비가 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 첨가하였다. 여기에 환원제인 나트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH₄)

3, Sigma사)를 최종 농도 20 mM이 되도록 첨가하고, 4°C에서 천천히 교반하면서 3시간 동안 반응시켰다. 인터페론 알파의 아미노 말단 부위에 선택적으로 PEG가 연결되고, PEG와 인터페론 알파가 1:1로 결합된 연결체를 얻기 위하여 상기 반응 혼합물을 가지고 슈퍼덱스 (Superdex^R, Pharmacia, 미국) 크기 배제 (size exclusion) 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충용액 (pH 6.0)을 사용하여 IFN α -PEG를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 인터페론 알파, 미반응 PEG 및 2개의 인터페론 알파가 PEG와 연결된 이량체 부산물을 제거하였다. 정제된 IFN α -PEG를 5 mg/ml 농도로 농축하였다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 IFN α : PEG의 최적 반응 몰비는 1:2.5 내지 1:5임이 확인되었다.

<76> <단계 3> 인터페론 알파-PEG 연결체와 면역글로불린 Fc 영역의 결합체 형성

<77> 상기 단계 2에서 정제된 IFN α -PEG 연결체에 면역글로불린 Fc 영역를 결합시키기 위하여 단계 1에서 준비된 10 mM 인산염 완충용액에 용해된 면역글로불린 Fc 영역 (분자량: 약 52 kDa)을 IFN α -PEG 연결체 : Fc의 몰비가 각각 1:1, 1:2, 1:4 및 1:8이 되도록 첨가하여 반응시켰다. 반응액을 100 mM 인산염 완충용액 상태로 만들었고, 환원제로서 NaCNBH₃를 최종 농도가 20 mM이 되도록 첨가한 후 4°C에서 20시간 동안 천천히 교반하면서 반응시켰다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 IFN α -PEG 연결체 : Fc의 최적 반응 몰비는 1:2임이 확인되었다.

<78> <단계 4> 인터페론 알파-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 분리 및 정제

<79> 상기 단계 3의 응합반응 후 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 정제하기 위하여 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 각 반응 혼합물을 농축한 후 인산염 완충용액 (PBS, pH 7.3)을 이용하여 유속 2.5 mL/분으로 컬럼에 통과시켜 결합되지 않은 IgG Fc 및 미반응 물질을 제거하고 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체 분획을 정제하였다 (도 3). 이로부터 얻어진 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체 분획에는 불순물로서 소량의 미반응 IgG Fc 및 인터페론 알파 이량체가 혼재되어 있기 때문에 이를 제거하기 위해 추가로 양이온 교환수지 크로마토그래피를 수행하였다. IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체 분획을 10 mM 아세트산 나트륨 (pH 4.5)으로 평형화시킨 컬럼 (PolyCAT LP, PolyLC Inc., 미국)에 넣고 1 M 염화나트륨 (NaCl)을 포함한 10 mM 아세트산 나트륨 (pH 4.5) 완충용액을 직선 농도구배 (염화나트륨 농도 0 M → 0.5 M) 방법으로 흘려 추가로 정제하였고, 마지막으로 음이온 교환컬럼을 사용하여 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다. 폴리왁스 엘피 (PolyWAX LP, PolyLC Inc., 미국) 컬럼을 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 평형화시킨 후 정제된 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체 분획을 부하하고 1 M 염화나트륨을 포함한 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액을 직선 농도구배 (염화나트륨 농도 0 M → 0.3 M) 방법으로 흘려 순수한 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 정제하였다 (도 4).

<80> <실시 예 2> 인터페론 알파-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조 Ⅱ

<81> <단계 1> 면역글로불린 Fc 영역과 PEG 연결체의 제조

<82> 양쪽 말단에 알데히드 반응기를 가진, 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌글리콜인 ALD-PEG-ALD (Shearwater Inc. 미국)를 상기 실시 예 1의 단계 1에서 준비된 면역글로불린 Fc

영역이 15 mg/ml 농도로 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 면역글로불린 Fc 영역 : PEG의 몰비가 각각 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 첨가하였다. 환원제인 NaCNBH₃를 최종 농도 20 mM로 첨가한 후, 4°C에서 천천히 교반하면서 3시간 동안 반응시켰다. 면역글로불린 Fc 영역의 아미노 말단 부위에 선택적으로 PEG : 면역글로불린 Fc 영역이 1:1로 결합한 연결체를 얻기 위하여 상기 반응 혼합물을 가지고 슈퍼덱스 (Superdex^R, Pharmacia, 독일) 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충용액 (pH 6.0)을 사용하여 IgG Fc-PEG-ALD를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 면역글로불린 Fc 영역, 미반응 PEG 및 2개의 면역글로불린 Fc 영역이 PEG와 연결된 이량체 부산물을 제거하였다. 정제된 IgG Fc-PEG 연결체를 약 15 mg/ml로 농축하였다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 IgG Fc : PEG의 최적 반응 몰비는 1:3 내지 1:10임이 확인되었다.

<83> <단계 2> 면역글로불린 Fc 영역-PEG 연결체와 인터페론 알파의 결합체 형성

<84> 상기 단계 1에서 정제된 IgG Fc-PEG 연결체에 인터페론 알파-2b (Interferon α-2b, IFN α-2b, 분자량 20 kDa)를 융합시키기 위하여 10 mM 인산염 완충용액에 용해된 인터페론 알파를 사용하고, IgG Fc-PEG 연결체 : 인터페론 알파-2b의 몰비를 각각 1:1, 1:1.5, 1:3 및 1:6이 되도록 첨가하여 반응시켰다. 반응액을 100 mM 인산염 완충용액 상태로 만들었고, 환원제로서 NaCNBH₃를 최종 농도가 20 mM이 되도록 첨가한 후 4°C에서 20 시간 동안 천천히 교반하면서 반응을 진행시켰다. 반응 후 실시예 1의 단계 3과 동일한 방법으로 정제하여 미반응 물질 및 부산물을 제거하고, 이로부터 생성된 IgG Fc-PEG-IFN α 단백질 결합체를 순수하게 분리하였다.

<85> <실시 예 3> 인간 성장호르몬-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

<86> 인터페론 알파-2b 대신에 인간 성장호르몬 (hGH, 분자량 22 kDa)을 사용하고, 인간 성장호르몬과 ALD-PEG-ALD (분자량 3.4 kDa)의 몰비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 hGH-PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 제조 및 정제하였다.

<87> <실시 예 4> 인간 과립구 콜로니 자극인자-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

<88> 인터페론 알파-2b 대신에 인간 과립구 콜로니 자극인자 (G-CSF)를 사용하고, G-CSF와 ALD-PEG-ALD (분자량 3.4 kDa)의 몰비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 G-CSF-PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

<89> 한편, 천연형 G-CSF의 17번째 아미노산이 세린으로 치환된 유도체 (¹⁷S-G-CSF)를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 G-CSF 유도체-PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

<90> <실시 예 5> 인간 적혈구 생성인자-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

<91> 인터페론 알파-2b 대신 인간 적혈구 생성인자 (Erythropoietin; EPO)를 사용하고, EPO와 ALD-PEG-ALD (분자량 3.4 kDa)의 몰비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 EPO-PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

<92> <실시 예 6> 반응기의 종류를 달리하는 PEG를 이용한 단백질 결합체의 제조

<93> 양쪽 말단의 반응 그룹이 모두 석시니미딜 프로피오네이트 (succinimidyl propionate; SPA)인 PEG를 사용하여 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 다음과 같이 제조하였다. 인터페론

알파 10 mg이 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 양쪽 말단에 SPA 반응기를 갖는, 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌글리콜인 SPA-PEG-SPA (Shearwater Inc. 미국)를 인터페론 알파 : PEG의 몰비가 각각 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 정량하여 첨가하고, 상온에서 천천히 교반하면서 2시간 동안 반응시켰다. 인터페론 알파의 라이신 잔기의 아미노 그룹 부위에 선택적으로 PEG가 1:1로 결합된 PEG-IFN α 연결체를 얻기 위하여 반응 혼합물을 가지고 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충용액 (pH 6.0)을 사용하여 IFN α -PEG 연결체를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 인터페론 알파, 미반응 PEG 및 PEG의 양쪽 말단 모두에 2개의 인터페론 알파가 연결된 이량체 부산물을 제거하였다. IFN α -PEG 연결체에 면역글로불린 Fc를 융합하기 위하여 정제된 IFN α -PEG 연결체를 약 5 mg/ml로 농축한 후, 실시예 1과 동일한 방법으로 IFN α -PEG-IgG Fc 결합체를 제조하였다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 인터페론 알파 : PEG의 최적 반응 몰비는 1:2.5 내지 1:5임이 확인되었다.

<94> 한편, 상기와 동일한 방법을 수행하되 양쪽 말단의 반응 그룹이 모두 N-하이드록시석시니미딜 (N-hydroxysuccinimidyl; NHS) 또는 부틸알데히드 (Butyl aldehyde)인 PEG (NHS-PEG-NHS; Shearwater Inc, 미국) 또는 BUA-PEG-BUA를 사용하여 IFN α -PEG-IgG Fc 결합체의 생성을 확인하였다.

<95> <실시예 7> 분자량이 다른 PEG를 이용한 단백질 결합체의 제조

<96> 분자량이 1,000 Da이고, 양쪽 말단에 알데히드 화학적 반응기를 가진 폴리에틸렌글리콜인 ALD-PEG-ALD (Shearwater Inc. 미국)를 사용하여 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 IFN

α -PEG 연결체를 제조 및 정제하였다. 이때, 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 인터페론 알파 : PEG의 최적 몰비는 1:2.5 내지 1:5임이 확인되었다. 정제된 IFN α -PEG 연결체를 약 5 mg/ml이 되도록 농축한 후, 이를 이용하여 실시예 1의 단계 3과 동일한 방법으로 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체를 제조 및 정제하였다.

<97> <비교예 1> PEG-인터페론 알파 연결체의 제조

<98> 100 mM 인산칼륨 완충용액 (pH 6.0)에 인터페론 알파 5 mg을 넣어 최종 부피 5 ml가 되도록 준비한 후, PEG의 분자량이 40 kDa인 활성화된 메톡시-PEG-알데히드 (Shearwater사, 미국)를 인터페론 알파 : PEG의 몰비가 1:4가 되도록 상기 용액에 첨가하였다. 상기 반응용액에 환원제인 NaCNBH₃를 최종 농도 20 mM이 되도록 첨가한 후, 4°C에서 18시간 동안 서서히 교반시키면서 반응시켰다. 인터페론 알파에 반응하지 않은 PEG를 불활성화시키기 위해 에탄올아민을 최종 농도가 50 mM이 되도록 첨가하였다.

<99> 미반응 PEG의 분리 및 완충용액 교체를 위해 세파텍스 G-25 컬럼 (Pharmacia사)을 이용하였다. 먼저, 2 칼럼 부피 (column volume; CV)의 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 컬럼을 평형화시킨 후 반응 혼합물을 점滴하였고, 파장 260 nm에서 자외부 흡광계로 흡광도를 검출하였다. 상기 컬럼을 동일한 완충용액으로 용출하면 크기가 더 큰 PEG로 수식된 인터페론 알파가 먼저 용출되고 미반응 PEG는 시차를 두고 나중에 용출되기 때문에 PEG-IFN α 만을 분리 할 수 있다.

<100> 상기에서 얻은 용출액으로부터 PEG-IFN α 연결체를 더욱 순수하게 분리·정제하기 위해 다음을 수행하였다. 3 ml의 폴리왁스 엘피 (PolyWAX LP, Polywax Inc., 미국) 컬럼을 10 mM

Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 평형화시켰다. PEG-IFN α 연결체를 함유하는 용출액을 1 mL/분의 유속으로 캘럼 상에 부가한 후, 15 mL의 평형 완충용액으로 세척하였다. 30 mL의 1 M NaCl 완충용액으로 30분 동안 0에서 100%까지의 염 농도구배 방법을 이용하여 트리-, 디- 및 모노-PEG가 결합된 인터페론 알파를 순서대로 용출시켰다.

101> 더욱 순수한 모노-PEG 결합 인터페론 알파를 분리하기 위해 상기에서 수득한 모노-PEG와 인터페론 알파의 연결체 용출분획을 가지고 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 10 mM 인산나트륨 완충용액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 슈퍼덱스 200 (Superdex 200, Pharmacia사)에 상기 용출액을 농축하여 점적한 후 동일한 완충용액으로 용출하였다. 이때, 1 mL/분의 유속으로 완충용액을 흘려주었다. 트리- 및 디-PEG가 결합된 인터페론 알파는 모노-PEG가 결합된 인터페론 알파보다 용출시간이 상대적으로 빠르므로 이를 제거하여 모노-PEG이 결합된 인터페론 알파만을 순수하게 분리하였다.

102> 동일한 방법으로 인간 성장호르몬, 과립구 콜로니 자극인자 및 그의 유도체의 아미노 말단에 40 kDa PEG가 결합된 PEG-hGH몬, PEG-G-CSF 연결체 및 PEG-17S-G-CSF 유도체를 제조하였다.

103> <비교예 2> 인터페론 알파-PEG-알부민 결합체의 제조

104> 실시예 1의 단계 2에서 정제된 IFN α -PEG 연결체에 알부민을 결합시키기 위하여 10 mM 인산염 완충용액에 용해된 인간 알부민 (Human Serum Albumin, HSA, 약 67 kDa)(녹십자, 한국) 을 IFN α -PEG 연결체 : 알부민의 몰비가 각각 1:1, 1:2, 1:4 및 1:8이 되도록 첨가한 후 반응 시켰다. 반응액을 100 mM 인산염 완충용액 상태로 만들었고, 환원제로서 NaCNBH₃를 최종 농도

가 20 mM이 되도록 첨가한 후 4°C에서 20시간 동안 천천히 교반하면서 반응시켰다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 IFN α -PEG 연결체 : 알부민의 최적 반응 몰비는 1:2임이 확인되었다.

105> 응합반응 후 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 IFN α -PEG-알부민 단백질 결합체를 정제하기 위하여 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 각 반응 혼합물을 농축한 후 10 mM 아세트산 나트륨 완충용액을 유속 2.5 mL/분으로 컬럼에 통과시켜 결합되지 않은 알부민 및 미반응 물질을 제거하고 IFN α -PEG-알부민 단백질 결합체만을 정제하였다. 얻어진 IFN α -PEG-알부민 단백질 결합체 분획에는 불순물로서 소량의 미반응 알부민 및 인터페론 알파 이량체가 섞여 있으므로 이를 제거하기 위해 추가로 양이온 교환수지 크로마토그래피를 수행하였다. IFN α -PEG-알부민 단백질 결합체 분획을 10 mM 아세트산 나트륨 (pH 4.5)으로 평형화시킨 컬럼 (SP5PW, Waters, 미국)에 넣고 1 M 염화나트륨 (NaCl)을 포함한 10 mM 아세트산 나트륨 (pH 4.5) 완충용액을 직선 농도구배 (염화나트륨 농도 0 M → 0.5 M) 방법으로 흘려 추가로 정제하였고, IFN α -PEG-알부민 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

106> 동일한 방법으로 인간 성장호르몬, G-CSF 및 그의 유도체에 각각 알부민이 결합된 hGH-PEG-알부민, G-CSF-PEG-알부민 및 17 S-G-CSF 유도체-PEG-알부민 단백질 결합체를 제조하였다.

107> <실험예 1> 단백질 결합체의 확인 및 정량

108> (1) 단백질 결합체의 확인

109> 상기 실시예들에서 제조한 단백질 결합체는 4 내지 20% 농도구배 겔을 사용한 SDS-PAGE 및 ELISA (R&D system, 미국) 방법을 이용하여 확인하였다. 이때, IFN α 및 IFN α -PEG는 DTT (Dithiothreitol)를 각각 50 mM의 양으로 첨가한 후 SDS-PAGE를 실시하였고, IgG Fc 및 IFN α -PEG-IgG Fc는 DTT 없이 전개시켰다.

110> 각 단백질의 SDS-PAGE 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 커플링 반응 후 생성된 IFN α -PEG-IgG Fc (A), ^{17}S er-G-CSF 유도체-PEG-IgG Fc (B) 및 EPO-PEG-IgG Fc (C) 결합체를 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이다.

111> (2) 단백질 결합체의 정량

112> 상기 실시예에서 제조한 각각의 단백질 결합체의 양은 슈퍼덱스 컬럼 (Superdex, Pharmacia사)과 10 mM 칼륨-포스페이트 완충용액 (pH 6.0)을 용출액으로 사용하는 크기 배제 크로마토그래피 상에서 피크면적을 대조구와 비교하여 환산하는 방법으로 계산하였다. 이미 정량되어 있는 IFN- α , hGH, G-CSF, ^{17}S -G-CSF, EPO 및 IgG Fc로 각각 크기 배제 크로마토그래피를 실시한 후 농도와 피크면적 간의 환산계수를 측정하였다. 각 단백질 결합체의 일정량을 사용하여 동일한 크기 배제 크로마토그래피를 실시하고, 여기서 얻어진 피크면적에서 면역글로불린 Fc 영역에 해당하는 피크면적을 뺀 값을 각 단백질 결합체에 존재하는 생리활성 단백질의 정량 값으로 결정하였다.

113> 크로마토그래피 방법 이외에 ELISA (R&D system, 미국) 방법을 병행하였다. IgG Fc가 생리활성 폴리펩타이드에 결합되면 생리활성 폴리펩타이드의 항체로 그 양을 정량할 때 항체와 상기 폴리펩타이드와의 결합이 저해되어 크로마토그래피에 의해 계산되는 실제 값보다 적게 정

량되는데, IFN α -PEG-IgG Fc의 경우에는 ELISA에 의해 측정된 값이 대략 실제 값의 약 30% 정도인 것으로 확인되었다.

114> (3) 단백질 결합체의 순도 및 질량 확인

115> 각각의 실시예에서 얻은 단백질 결합체에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 실시한 후 280 nm에서 흡광했을 때, IFN α -PEG-IgG Fc, hGH-PEG-IgG Fc, G-CSF 및(¹⁷Ser-G-CSF)-PEG-IgG Fc는 분자량 70,000 내지 80,000 Da인 물질의 체류시간대에서 단일피크를 나타내었다. 도 4는 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체의 크로마토그래피 결과를 나타낸 것이다. 한편, EPO-PEG-IgG Fc의 경우에는 분자량이 약 88,000 Da에 해당하는 위치에서 단일피크가 확인되었다.

116> 각 정제된 시료의 정확한 분자량을 확인하기 위하여, MALDI-TOF (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, USA) 초고속 질량분석기를 이용하여 이들의 질량을 측정하였다. 매트릭스로는 시나핀산 (sinapinic acid)을 사용하였으며, 각각의 시험용 시료 0.5 μ l를 시료 슬라이드에 도포하여 자연 건조한 후, 동량의 매트릭스 용액을 첨가한 다음 다시 자연 건조시켜 이온 원 (ion source)에 도입하였다. 검출은 포지티브 방식으로 리니어 모드 TOF 방식 장치를 사용하여 수행하였으며, 이온은 지연된 이온 추출 (DE)을 사용하는 분할 추출 공급원에서, 지연된 추출 시간은 750 nsec/1500 nsec로, 약 2.5 kV의 전체 전위차를 통해 가속화하였다.

117> 하기 표 1은 상기 실시예에서 얻은 각각의 IgG Fc 단백질 결합체의 질량분석 결과를 나타낸 것이고, 도 5는 EPO-PEG-IgG Fc 결합체의 질량분석 결과를 나타낸 것이다. 그 결과, 수득된 EPO-PEG-IgG Fc 단백질 결합체의 순도는 90% 이상이었고, 이론치와 매우 가까운 분자량을

나타내었다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역에 적혈구 생성인자 (EPO)가 1:1로 결합된 형태인 것으로 나타났다.

118> 【표 1】

| | 이론치 (kDa) | 측정치 (kDa) |
|--|-----------|-----------|
| IFN α -PEG-IgG Fc (실시예 1) | 72.8 | 72.6 |
| hGH-PEG-IgG Fc (실시예 3) | 75.6 | 75.6 |
| G-CSF-PEG-IgG Fc (실시예 4) | 72.3 | 72.8 |
| ^{17}S -G-CSF 유도체-PEG-IgG Fc (실시예 4) | 72.1 | 72.2 |
| EPO-PEG-IgG Fc (실시예 5) | 87.6 | 88.0 |

119> <실험 예 2> 약물동력학 조사

120> 각 군당 5 마리의 SD 랫트 (Rat)에 천연형 생리활성 단백질 (대조군)과 상기 실시예 및 비교예에서 제조한 단백질 결합체, PEG 결합단백질 및 알부민 단백질 결합체의 혈액내 안정성 및 약물동력학 계수를 비교하였다. 대조군 및 PEG-연결체, 알부민 단백질 결합체 및 본 발명의 단백질 결합체 (시험군)를 각 100 μ g/kg씩 피하주사한 후, 대조군은 주사 후 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 및 96시간 후에 채혈하였고, 시험군은 주사 후 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 및 288 시간 후에 채혈하였다. 혜파린을 함유하는 튜브에 혈액시료를 모아 응고를 방지하였고, 에펜도르프 고속 마이크로 원심분리기에서 5분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 혈장 내 단백질 양은 각 생리활성 단백질에 대한 항체를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

121> 인터페론 알파, 인간 성장호르몬, 과립구 콜로니 자극인자 및 적혈구 생성인자의 천연형 단백질과 PEG-연결체, 알부민 및 면역글로불린 Fc 영역이 각각 PEG를 매개체로 하여 결합된 단백질 결합체의 약물동력학을 하기 표 2 내지 표 6에 나타내었다. 하기 표에서 T_{max} 는 최고 약물 농도에 도달하는 시간을, $T_{1/2}$ 는 약물의 혈중 반감기를, MRT (mean residence time)는 약물 분자의 평균적인 체내 체류시간을 의미한다.

122> 【표 2】

인터페론 알파의 약물동력학

| | 천연형 IFN α | IFN α-40K PEG (비교예 1) | IFN α-PEG-알부민 (비교예 2) | IFN α-PEG-IgG Fc (실시예 1) |
|----------------|-----------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| T_{max} (hr) | 1.0 | 30 | 12 | 30 |
| $T_{1/2}$ (hr) | 1.7 | 35.8 | 17.1 | 79.7 |
| MRT (hr) | 2.1 | 71.5 | 32.5 | 104.5 |

123> 【표 3】

인간 성장호르몬의 약물동력학

| | 천연형 hGH | hGH-40K PEG (비교예 1) | hGH-PEG-알부민 (비교예 2) | hGH-PEG-IgG Fc (실시예 3) |
|----------------|---------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| T_{max} (hr) | 1.0 | 12 | 12 | 12 |
| $T_{1/2}$ (hr) | 1.1 | 7.7 | 5.9 | 11.8 |
| MRT (hr) | 2.1 | 18.2 | 13.0 | 18.8 |

1000030080299

출력 일자: 2005/1/7

124> 【표 4】

과립구 콜로니 자극인자의 약물동력학

| | 천연형 G-CSF | G-CSF-40K PEG (비교예 1) | G-CSF-PEG-알부민 (비교예 2) | G-CSF-PEG-IgG Fc (실시예 4) |
|-----------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Tmax (hr) | 2.0 | 12 | 12 | 12 |
| T _{1/2} (hr) | 2.8 | 4.8 | 5.2 | 6.9 |
| MRT (hr) | 5.2 | 24.5 | 25.0 | 32.6 |

125> 【표 5】

콜로니 자극인자 ¹⁷S-G-CSF 유도체의 약물동력학

| | 천연형 ¹⁷ S-G-CSF 유 도체 | ¹⁷ S-G-CSF 유도체 -40K PEG (비교예 1) | ¹⁷ S-G-CSF 유도체 -PEG-알부민 (비교예 2) | ¹⁷ S-G-CSF 유도체 -PEG-IgG Fc (실시예 4) |
|-----------------------|-----------------------------------|--|--|---|
| Tmax (hr) | 2.0 | 24 | 24 | 24 |
| T _{1/2} (hr) | 2.9 | 4.3 | 6.4 | 7.0 |
| MRT (hr) | 5.8 | 24.4 | 25.1 | 33.2 |

126> 【표 6】

적혈구 생성인자의 약물동력학

| | 천연형 EPO | 고 당쇄화 EPO (Darbepoetin-α) | EPO-PEG-IgG Fc (실시예 5) |
|-----------------------|---------|------------------------------|---------------------------|
| T _{max} (hr) | 6.0 | 12 | 30 |
| T _{1/2} (hr) | 9.4 | 18.4 | 61.5 |
| MRT (hr) | 21.7 | 36.7 | 117.6 |

127> 상기 표 2 및 도 6의 약물 동력학 그래프에서 알 수 있듯이, IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체의 경우 혈중 반감기는 79.7시간으로서 천연형 인터페론 알파에 비해 약 40배 증가하였으며, 이는 비교예에서 제조한 40 kDa PEG-IFN α 의 반감기인 35.8시간보다 약 2배 증가한 것이다. PEG의 한쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역대신 알부민이 결합된 IFN α -PEG-알부민의 경우 반감기가 17.1시간으로, 본 발명의 단백질 결합체가 월등히 우수한 혈중 반감기를 나타냄을 확인하였다.

128> 또한, 표 3을 살펴보면, 인간 성장호르몬의 경우도 인터페론 알파와 비슷한 결과를 보여주고 있으며, 본 발명의 단백질 결합체가 나타내는 혈중 반감기의 증가 효과를 확인할 수 있다. 천연형 인간 성장호르몬은 반감기가 1.1 시간이고 40 kD PEG를 결합시킨 경우는 반감기가 7.7시간으로 증가하였으며, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역 대신 알부민을 결합시킨 경우에는 5.9시간으로 나타났다. 이에 비해 본 발명의 단백질 결합체의 경우에는 혈중 반감기가

무려 11.8시간으로 획기적으로 증가하였고, 이러한 결과로부터 인간 성장호르몬 치료시의 투여 빈도를 획기적으로 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

129> 표 4 및 표 5에서 보듯이, 과립구 콜로니 자극인자와 그의 유도체에 대한 혈중 지속성도 상기 인터페론 알파 및 인간 성장호르몬을 이용한 실험결과와 유사한 경향을 나타내었다. 천연형 과립구 콜로니 자극인자와 그의 유도체보다 40 kD PEG가 수식된 단백질과 일부민을 결합시킨 경우가 천연형보다 혈중 반감기가 길게 나타났지만, 이를 모두에 비하더라도 본 발명의 면역글로불린 Fc 단백질 결합체가 가장 긴 혈중 반감기를 나타내었다. 단백질의 혈중 지속성을 증가시키는 면역글로불린 Fc 영역의 효과는 천연형 생리활성 단백질 뿐만 아니라 일부 아미노산을 변형시킨 유도체에서도 천연형과 비슷한 정도임을 확인할 수 있었고, 이러한 결과로부터 본 발명의 방법이 다른 단백질의 유도체에서도 유사한 효과를 나타낼 것임을 쉽게 예상할 수 있다.

130> 표 6 및 도 7에서 보듯이, 당쇄화가 되어 있는 천연형 단백질인 적혈구 생성인자 (erythropoietin; EPO)에 대해서도 본 발명의 단백질 결합체의 혈중 반감기 증가효과가 확인되었다. 즉, 천연형 적혈구 생성인자의 혈중 반감기가 9.4시간이고, EPO를 고 당쇄화시켜 혈중 안정성을 높인 EPO (Darbepoetin- α , Aranesp, Amgen, USA)의 경우는 반감기가 18.4시간으로 증가하는 것으로 나타났다. 적혈구 생성인자에 면역글로불린 Fc 영역을 결합시킨 본 발명의 EPO-PEG-IgG Fc 결합체의 경우에는 혈중 반감기가 무려 61.5시간으로 획기적으로 증가하였다.

131> 상기 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 면역글로불린 Fc 영역 및 비펩타이드성 중합체와 공유결합된 단백질 결합체들은 천연형 단백질들에 비해 수배에서 수십배 이상 증가된 혈중 반감기를 나타내었다. 특히, 기존의 단백질 혈중 지속성을 증가시키기 위한 PEG 제형 중 지속성이 가장 높은 40 kD PEG를 수식한 단백질과의 비교에서도 면역글로불린 Fc 단백

질 결합체가 월등하게 높은 혈중 안정성을 나타내었다. 또한, 면역글로불린 Fc 대신 알부민을 결합시킨 단백질 결합체와의 비교시험에서도 본 발명의 단백질 결합체가 탁월한 혈중 안정성을 보여줌으로써 본 발명의 단백질 결합체가 지속형 단백질 약물 제제 개발에 효과적임을 확인할 수 있었다. 점 둘연변이에 의한 콜로니 자극인자 유도체까지 광범위한 범위의 단백질에서 종래의 PEG 결합 단백질 또는 알부민 단백질 결합체보다 탁월한 혈중 안정성과 평균 체류시간 (MRT)을 나타내는 결과를 볼 때, 본 발명의 단백질 결합체에 의한 안정성 및 지속성 증가 효과는 다른 생리활성 폴리펩티드에도 적용 가능함을 알 수 있다.

132> 한편, 비펩타이드성 중합체로서 10 kD PEG를 사용한 IFN α -PEG-IgG Fc 단백질 결합체 (실시예 7)를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 혈중 반감기를 측정했을 때, 혈중 반감기는 48.8시간으로 나타나 분자량 3.4 kD인 PEG를 사용한 단백질 결합체의 혈중 반감기인 79.7시간 보다 다소 감소하였다. 비펩타이드성 중합체인 PEG의 분자량 증가에 따라 혈중 반감기는 오히려 다소 감소하였는데, 이러한 결과로부터 단백질 결합체의 혈중 안정성 및 지속성 증가의 주된 요인이 비펩타이드성 중합체의 분자량보다는 결합된 면역글로불린 Fc 영역에 의한 효과인 것임을 확인할 수 있다. PEG의 반응 그룹을 변화시킨 경우에도 곁보기 분자량과 혈중 반감기가 알데하이드 반응기를 갖는 PEG를 사용한 경우와 유사한 양상을 보였다.

133> <실험예 3> 세포내 활성 측정

134> (1) 인터페론 알파 단백질 결합체의 세포내 활성비교

135> 인터페론 알파 단백질 결합체의 세포내 활성비교를 위하여 IFN α -PEG-IgG Fc (실시예 1), 40 kD PEG-IFN α (비교예 1) 및 IFN α -PEG-알부민 (비교예 2)의 항바이러스 활성을 수포성

구내염 바이러스로 포화시킨 마딘-다비 (Madin-Darby) 소 신장 세포 (MDBK, Madin Darby Bovine Kidney, ATCC CCL-22)를 사용하는 세포배양 생검으로 측정하였다. 이때, PEG가 결합되지 않은 인터페론 알파-2b (NIBSC 국제표준품)를 대조군으로 사용하였다.

136> MDBK 세포를 MEM (minimum essential medium: JBI)에 10% FBS 및 1% 페니실린 스트렙토マイ신이 첨가된 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 측정하고자 하는 시료와 표준물질 (NIBSC 국제표준품)을 일정 농도로 세포 배양 배지에 희석하여 96 웰 플레이트의 각 웰에 100 μl씩 분주하였다. 상기에서 배양된 세포를 플라스크에서 떼어내어 시료가 분주되어 있는 플레이트에 100 μl씩 가한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 약 1시간 가량 배양하였다. 1시간 후 바이러스 농도가 5 내지 7×10³ PFU가 되도록 조절된 VSV (Vesicular stomatitis virus)를 50 μl씩 플레이트에 첨가시켜 주었다. 음성 대조군으로 시료 및 표준물질을 넣지 않고 세포와 바이러스만을 넣은 웰을, 양성 대조군으로 바이러스 희석용액을 넣지 않고 세포만 넣은 웰을 만들었고, 모든 시험군은 37°C, 5% CO₂의 조건에서 약 16 내지 20시간 추가로 배양하였다.

137> 배양액을 제거하고 살아있는 세포를 염색하기 위하여 뉴트랄 레드 (neutral red) 용액 100 μl씩을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거한 후 100% 에탄올과 1% 아세트산을 1:1로 섞어서 100 μl씩 넣어주었다. 염색된 세포를 잘 흔들어서 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군을 블랭크 (blank)로 하고, 양성 대조군을 세포 성장 100%로 간주하여 50% 세포 성장 부분의 농도 (ED₅₀)를 계산하였다.

138> 【표 7】

인터페론 알파의 시험관내 활성 분석

| | 농도 (ng/ml) | ED ₅₀ (IU/mg) | 천연형 IFN α에 대한 상대적 활성 (%) |
|------------------|------------|--------------------------|--------------------------|
| 천연형 IFN α | 100 | 4.24E+08 | 100 |
| IFN α-40K PEG | 100 | 2.04E+07 | 4.8 |
| IFN α-PEG-알부민 | 100 | 2.21E+07 | 5.2 |
| IFN α-PEG-IgG Fc | 100 | 1.19E+08 | 28.1 |

139> 표 7에서 보는 바와 같이, PEG에 의해 수식된 인터페론 알파는 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있다. 특히, 수식된 PEG의 크기가 클수록 혈중 안정성은 증가하지만 상대적으로 활성도가 점차 떨어지는데, 40 kD의 PEG가 수식된 경우 표준형 인터페론 알파의 활성도의 약 4.8%를 갖는 것으로 나타났다. 인터페론 알파의 경우, 12 kD PEG가 수식된 경우에는 25%, 40 kD PEG가 수식된 경우에는 약 7% 정도의 시험관내 활성을 갖는다고 보고된 바 있다 (P. Bailon et al., *Bioconjugate Chem.* 12: 195~202, 2001). 즉, PEG의 분자량이 증가하면 혈중 반감기는 길어지게 되나 상대적으로 약효가 급격하게 감소되므로, 혈중 반감기가 길면서 약효도 뛰어난 물질의 개발이 요구되고 있다.

140> 한편, 알부민을 결합시킨 경우 인터페론 알파의 시험관내 활성은 천연형에 비하여 약 5.2% 정도로 낮은 활성을 나타내었다. 그러나, 본 발명에 따라 면역글로불린 Fc 영역을 인터페론 알파에 결합시킨 경우는 천연형에 비하여 상대적 활성도가 28.1% 이상으로 획기적으로 높아짐을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터, 본 발명의 인터페론 알파와 면역글로불린 Fc

영역의 단백질 결합체는 인터페론 알파의 혈중 반감기를 획기적으로 증가시키고 생체내 약효를 향상시킬 것으로 기대할 수 있다.

141> (2) 인간 성장호르몬 단백질 결합체의 세포내 활성비교

142> 인간 성장호르몬 단백질 결합체의 세포내 활성을 비교하기 위하여 hGH-PEG-IgG Fc, 40 kD PEG-hGH 및 hGH-PEG-알부민의 세포내 활성을 비교 시험하였다.

143> 인간 성장호르몬 의존성 유사분열을 하는 세포인 랫트 결절 림포종 (rat node lymphoma) 세포주인 Nb2 세포 (European Collection of Cell Cultures (ECACC) #97041101)를 이용하여 세포내 활성도를 시험관내 분석을 통해 측정하였다.

144> Nb2 세포를 배양액 (Fisher's medium)에 10% 소 태아 혈청 (FBS, fetal bovine serum), 0.075% NaCO₃, 0.05 mM 2-메르캅토에탄올 및 2 mM 글루타민을 첨가한 배지에서 배양한 후, 10% 소 태아 혈청을 제외한 동일한 배지에서 24시간 동안 더 배양하였다. 배양액에서 배양된 세포의 수를 세어 약 20,000개의 세포를 96웰 플레이트의 각 웰에 넣은 후, hGH-PEG-IgG, 40 kDa PEG-hGH, hGH-PEG-알부민, 대조군인 국제표준품 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) 및 천연형 인간 성장호르몬 (HM-hGH)을 각각 희석하여 농도별로 첨가한 후 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 세포의 성장 정도 (각 웰의 세포 수)를 측정하기 위해 세포 염색액 (cell titer 96 Aqueous One Solution, Promega사, 미국)을 각 웰에 25 μl씩 넣은 후, 4시간 동안 배양하였다. 이후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료의 역ガ를 계산하고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

145> 【표 8】

인간 성장호르몬의 시험관내 활성 분석

| | 농도 (ng/ml) | 비활성* (U/mg) | 천연형 HM-hGH에 대한 상대적 활성 (%) |
|---|------------|-------------|---------------------------|
| 천연형 hGH | 100 | 2.71E+06 | 100 |
| hGH (NIBSC 국제표준품) | 100 | 2.58E+06 | 95.2 |
| hGH-40K PEG | 100 | 0.206E+06 | 7.6 |
| hGH-PEG-알부민 | 100 | 0.141E+06 | 5.2 |
| hGH-PEG-IgG Fc | 100 | 0.76E+06 | 28.1 |
| 비활성*= $1/ED_{50} \times 10^6$ (ED_{50} : 최대 세포 성장의 50%를 나타내는 단백질의 양) | | | |

146> 표 8에서 볼 수 있듯이, 시험에 사용한 모든 시료는 인간 성장호르몬 감수성 세포의 성장을 촉진시키는 것으로 보아 모두 활성이 있음을 알 수 있고, PEG에 의해 수식된 인간 성장호르몬은 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어지는 것으로 나타났다. 상기 실험에 3의 (1)에서 인터페론 알파의 경우 결합된 PEG의 분자량이 증가할수록 시험관내 활성이 감소함을 확인하였다. 인간 성장호르몬의 경우도 수식된 PEG의 크기가 클수록 그 활성도가 점차 떨어지는데, 40 kDa의 PEG가 수식된 인간 성장호르몬의 경우 천연형 인간 성장호르몬 활성도의 약 7.6%를 나타내는 것으로 나타났다. 또한, 알부민을 결합시킨 경우에 인간 성장호르몬의 시험관내 활성은 천연형 대비 약 5.2% 정도로 낮은 활성을 나타내었다. 그러나, 본 발명에 따라 면역글로불린 Fc 영역을 인간 성장호르몬에 결합시킨 경우는 상대적 활성도가 천연형 대비 28% 이상 획기적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터, 혈중 반감기의 획기적

증가와 더불어 인간 성장호르몬과 면역글로불린 Fc 영역의 단백질 결합체의 생체내 약효가 매우 뛰어날 것으로 기대할 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 단백질 결합체의 활성 증가는 면역글로불린 Fc 영역이 혈중 안정성을 증가시키고 수용체와의 결합력을 보존시키거나 비펩타이드성 중합체의 사용으로 인해 형성된 공간적 여유에 의한 것으로 파악되며, 이러한 작용은 다른 생리활성 단백질들의 면역글로불린 Fc 단백질 결합체에서도 유사할 것으로 기대된다.

147> (3) 과립구 콜로니 자극인자 단백질 결합체의 세포내 활성비교

148> 과립구 콜로니 자극인자 유도체 단백질 결합체의 세포내 활성비교를 위하여, 천연형 G-CSF (Filgrastim, 제일약품(주), 한국), ^{17}Ser -G-CSF 유도체, 20 kD PEG-G-CSF (Neulasta, USA), 40 kD PEG- ^{17}S -G-CSF 유도체, ^{17}Ser -G-CSF 유도체-PEG-알부민 및 ^{17}S -G-CSF 유도체-PEG-IgG Fc의 세포내 활성을 측정하였다.

149> 우선, 인간 골수 기원의 세포주인 HL-60 (ATCC CCL-240, Promyelocytic leukemia patient/36 yr old Caucasian female)을 10%의 소 태아 혈청을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하다가, 세포의 숫자를 약 2.2×10^5 세포/ mL 이 되도록 조정한 후, DMSO (dimethylsulfoxide, culture grade, Sigma)를 최종 1.25% (v/v)가 되도록 첨가하였다. 위의 세포주를 96웰 플레이트 (Corning/low evaporation 96 well plate)에 90 μl 씩 넣어서 웰당 세포가 약 2×10^4 개가 되도록 한 후, 5% CO_2 가 공급되는 37°C 배양기에서 약 72시간 동안 배양하였다.

150> G-CSF ELISA 키트 (R & D systems)를 이용하여 농도가 결정되어진 각 시료들을 동일한 농도가 되도록 적정한 비율로 RPMI 1640으로 희석하여 최종 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 하였고,

이를 다시 RPMI 1640으로 1/2로 희석하는 것을 19회 반복하였다. 이렇게 만들어진 시료를 배양 중인 HL-60 세포주의 각 웰에 10 μl 씩 가하여, 최종 농도가 1000 ng/ml로부터 연속적으로 반감되도록 하였다. 위에서 제조한 단백질 시료들을 처리한 세포주는 37°C 배양기에서 72시간 을 다시 배양하였다.

151> 배양후 세포주의 증가 정도를 알아보기 위하여, CellTiter96TM (Cat. No. G4100, Promega 사)을 이용하여 증가한 세포주의 숫자를 670 nm 파장에서의 흡광도로 결정하여 분석하였다.

152> 【표 9】

과립구 콜로니 자극인자 유도체의 시험관내 활성 분석

| | ED ₅₀ (IU/ml) | G-CSF에 대한 상대적 활성 (%) |
|--|--------------------------|----------------------|
| 천연형 G-CSF (Filgrastim) | 0.30 | 100 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체 | 0.26 | 115 |
| 20K PEG-G-CSF (Neulasta) | 1.20 | 25 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체-40K PEG | 10.0 | <10.0 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체-PEG-알부민 | 1.30 | 23.0 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체-PEG-IgG Fc | 0.58 | 51.7 |

153> 표 9에서 보는 바와 같이, 아미노산을 변화시킨 ¹⁷Ser-G-CSF 유도체의 면역글로불린 Fc 단백질 결합체도 천연형 단백질의 단백질 결합체와 비슷한 효과를 나타내었다. PEG에 의해 수식된 ¹⁷Ser-G-CSF 유도체는 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 혈중 반감기는 증가하지만 효력이 떨어짐을 이미 확인한 바 있다 (대한민국 특허출원 제2003- 17867호). 특히, 수식된

용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 단백질 약물의 지속형 제제는 잦은 주사로 인한 환자의 고통을 감소시킬 수 있고, 활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 지속적으로 유지하여 약효를 안정적으로 나타낼 수 있다.

156> 아울러, 본 발명의 단백질 결합체의 제조방법은 발현 시스템 확립의 어려움, 천연형과 상이한 당쇄화, 면역반응 유발, 단백질 융합 방향성의 제한 등 유전자 조작에 의한 융합단백질 생산방식의 단점과 반응의 비특이성으로 인한 낮은 수율 및 결합제로 사용되는 화학물질의 독성 문제 등 화학적 결합방식의 문제점을 극복하여 증가된 혈중 반감기와 활성을 갖는 단백질 약물을 용이하고 경제적인 방식으로 제공할 수 있다.

PEG의 크기가 클수록 혈중 안정성은 증가하지만 상대적으로 활성도가 점차 떨어짐을 알 수 있고, 40 kD의 PEG가 수식된 경우에는 $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체의 활성도에 비하여 약 10% 이하의 매우 낮은 활성도를 나타내었다. 즉, PEG의 분자량이 증가하면 혈중 반감기는 길어지게 되나 상대적으로 약효가 급격하게 감소되므로, 혈중 반감기가 길면서 약효도 뛰어난 품질의 개발이 요구되고 있다. 한편, 알부민을 결합시킨 경우 $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체의 시험관내 활성은 천연형에 비하여 약 23% 정도로 낮은 활성을 나타내었다. 그러나, 면역글로불린 Fc 영역을 $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체에 결합시킨 경우는 천연형에 비하여 상대적 활성도가 51% 이상으로 높아짐을 확인할 수 있었다. 이로부터 혈중 반감기의 획기적 증가와 더불어 면역글로불린 Fc 영역과 $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체의 결합체의 생체내 약효가 매우 뛰어날 것으로 기대할 수 있다.

154> 상기 결과로부터, 천연형 단백질을 이용한 경우와 마찬가지로 아미노산을 변화시킨 유도체 단백질에서도 면역글로불린 및 PEG의 공유결합에 의한 본 발명의 효과가 동일하게 나타남을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 단백질 결합체는 매일 주사를 맞아야 하는 천연형 G-CSF의 단점을 극복하면서 생리활성 단백질의 혈중 반감기와 생체내 활성을 획기적으로 증가시키는 목적을 동시에 충족시키는 지속형 제형으로서 효과적으로 이용될 수 있다.

【발명의 효과】

155> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 단백질 결합체는 폴리펩타이드 약물의 혈중 반감기 증가가 기존에 보고된 어떠한 변형 단백질보다도 높고, 기존 지속형 제형의 가장 큰 단점인 역가의 감소를 극복하여 종래·가장 효과가 좋은 것으로 알려진 알부민을 이용한 경우보다 월등한 혈중 지속성과 생체내 활성을 가질 뿐만 아니라, 면역반응 유발의 위험도 거의 없어 단백질 약물의 지속형 제재 개발에 유

【특허청구범위】**【청구항 1】**

생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결되어 있으며, 상기 폴리펩타이드의 생체내 안정성이 향상된 단백질 결합체.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역과 각각 공유결합에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 3】

제 2항에 있어서,

하나의 면역글로불린 Fc 영역에 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 비펩타이드성 중합체가 2개 이상 공유결합으로 연결되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

상기 면역글로불린이 Fc 영역이 단백질 가수분해효소로 절단되어 얻어지는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 5】

제 1항에 있어서,

상기 면역글로불린 Fc 영역이 혈액으로부터 얻은 천연형, 동물세포 배양이나 미생물로부터 얻어진 재조합형 및 이의 변이체로부터 유래된 Fc 영역으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 6】

제 1항에 있어서,

상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 및 이들의 혼합물로부터 유래된 Fc 영역으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 7】

제 6항에 있어서,

상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 이들의 혼합물로부터 유래된 Fc 영역으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 8】

제 6항에 있어서,

상기 면역글로불린 Fc 영역이 인간 면역글로불린 유래 Fc 영역인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 9】

제 2항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기가 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드 (maleimide) 그룹 및 석시나미드 (succinamide) 유도체로 구

성된 군으로부터 선택되는, 동일하거나 서로 다른 반응기인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 10】

제 9항에 있어서,

상기 석시나미드 유도체가 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸, 하이드록시석시니미딜 및 석시니미딜 카보네이트로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 11】

제 9항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 12】

제 1항에 있어서,

비펩타이드성 중합체의 분자량이 1 내지 100 kDa인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 13】

제 1항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 생리활성 폴리펩타이드의 아미노 말단, 라이신 잔기, 히스티딘 잔기 또는 시스테인 잔기의 유리 반응기에 결합되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 14】

제 1항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌글리콜 단독 중합체, 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 폴리락틱글리콜산, 생분해성 고분자 중합체, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 15】

제 14항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 16】

제 1항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 및 수용체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 17】

제 16항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장호르몬, 성장호르몬-방출 호르몬, 성장호르몬-방출 웅타이드, 인터페론, 콜로니 자극인자, 인터루킨, 마크로파지 활성인자, 마크로파지 웅타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독

소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 플라즈미노젠 활성인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤틱아제, 혈소판 유래 성장인자, 표피 성장인자, 오스테오제닉 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 결합조직 활성인자, 여포 자극호르몬, 황체 형성호르몬, 황체 형성호르몬-방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴랙신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장인자, 부신피질호르몬, 글루카곤, 콜레시스토카닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린-방출 펩타이드, 코티코트로핀-방출 인자, 갑상선 자극호르몬, 단일클론 항체, 폴리클론 항체, [Fab]', [Fab]'2, scFv의 항체 유도체, 바이러스 유래 백신 항원, 소 성장호르몬, 돼지 성장호르몬, 닭 성장호르몬의 동물 성장호르몬 및 동물 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 18】

제 17항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장호르몬, 인테페론 알파, 과립구 콜로니 자극인자 또는 적혈구 생성인자인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 19】

(a) 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체, 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역을 반응시켜 이들을 상호 공유결합에 의해 연결시키는 단계; 및

(b) 비펩타이드성 중합체의 양 말단에 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역이 상호 공유결합에 의해 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 제 1항의 단백질 결합체의 제조방법.

【청구항 20】

제 19항에 있어서,

단계 (a)는

(a1) 활성화된 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나를 공유결합에 의해 연결시키는 단계;

(a2) 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체와 결합된 면역글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩타이드 연결체를 분리하는 단계; 및

(a3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드 중 상기 연결체의 비펩타이드성 중합체에 이미 결합되어 있지 않은 나머지 성분을 공유결합에 의해 연결시켜 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 21】

제 20항에 있어서,

단계 (a1)에서 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체의 반응 몰비가 1:2.5 내지 1:5인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 22】

제 20항에 있어서,

단계 (a1)에서 면역글로불린 Fc 영역과 비펩타이드성 중합체의 반응 몰비가 1:5 내지 1:10인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 23】

제 20항에 있어서,

단계 (a3)의 반응물질인 단계 (a2)에서 수득된 연결체와 면역글로불린 Fc 영역 및 생리활성 폴리펩타이드 중 상기 연결체에 결합되어 있지 않은 나머지 성분과의 반응 몰비가 1:1 내지 1:3인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 24】

제 20항에 있어서,

단계 (a1) 및 단계 (a3)의 반응이 환원제의 존재 하에 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 25】

제 24항에 있어서,

상기 환원제가 나트륨 시아노보로하이드라이드 (NaCNBH_3), 수소화 붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염 및 피리딘 붕산염으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 26】

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항의 단백질 결합체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 지속성 단백질 약물 제제.

【청구항 27】

양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체에 생리활성 폴리펩타이드 및 면역글로불린 Fc 영역을 상호 공유결합에 의해 연결시키는 것을 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 안정성을 향상시키는 방법.

【청구항 28】

제 27항에 있어서,

하나의 면역글로불린 Fc 영역에 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 비펩타이드성 중합체를 2개 이상 공유결합에 의해 연결시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 29】

제 27항에 있어서,

상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM 및 이들의 혼합물로부터 유래된 Fc 영역으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 30】

제 29항에 있어서,

상기 면역글로불린 Fc 영역이 인간 면역글로불린 Fc 영역인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 31】

제 27항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기가 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 말레이이미드 (maleimide) 그룹 및 석시나미드 (succinamide) 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는, 동일하거나 서로 다른 반응기인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 32】

제 27항에 있어서,

비펩타이드성 중합체의 분자량이 1 내지 100 kDa인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 33】

제 27항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌글리콜 단독 중합체, 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 폴리락틱글리콜산, 생분해성 고분자 중합체, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 34】

제 33항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 35】

제 27항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 및 수용체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 36】

제 35항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장호르몬, 성장호르몬-방출 호르몬, 성장호르몬-방출 웨პ타이드, 인터페론, 콜로니 자극인자, 인터루킨, 마크로파지 활성인자, 마크로파지 웨პ타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고 당췌화 적혈구 생성인자, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 플라즈미노겐 활성인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장인자, 표피 성장인자, 오스테오제닉 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 결합조직 활성인자, 여포 자극호르몬, 황체 형성호르몬, 황체 형성호르몬-방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴액신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토카닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린-방출 웨პ타이드, 코티코트로핀-방출 인자, 갑상선 자극호르몬, 단일클론 항체, 폴리클론 항체, [Fab]¹, [Fab]^{1'2}, scFv의 항체 유도체, 바이러스 유래 백신 항원, 소 성장호르몬, 돼지 성장호르몬, 닭 성장호르몬의 동물 성장호르몬 및 동물 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 37】

제 36항에 있어서,

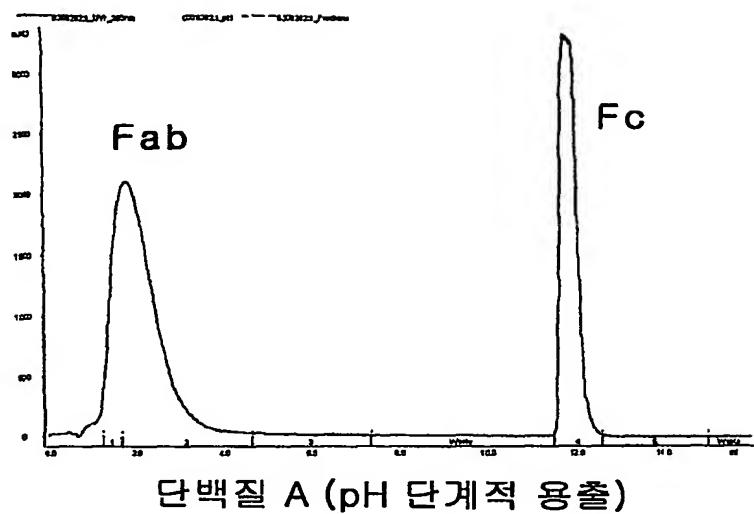
상기 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장호르몬, 인테페론 알파, 과립구 콜로니 자극인자 또는 적혈구 생성인자인 것을 특징으로 하는 방법.

1020030080299

출력 일자: 2005/1/7

【도면】

【도 1】

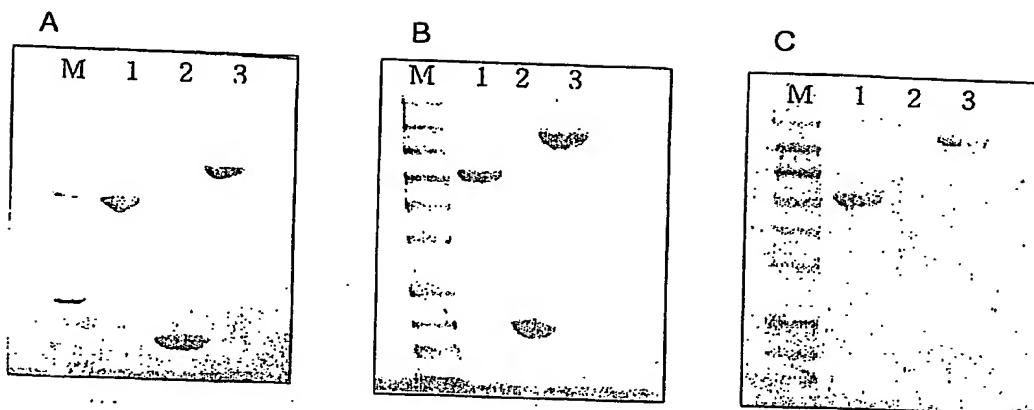


【도 2】

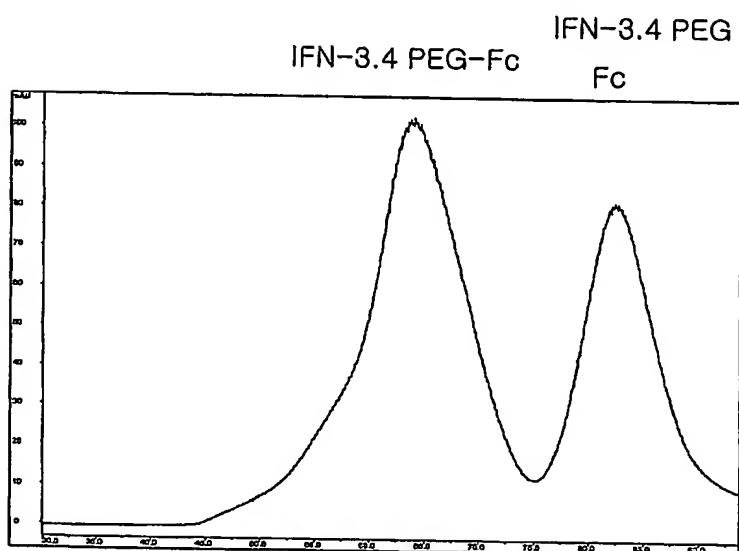
1 2 3



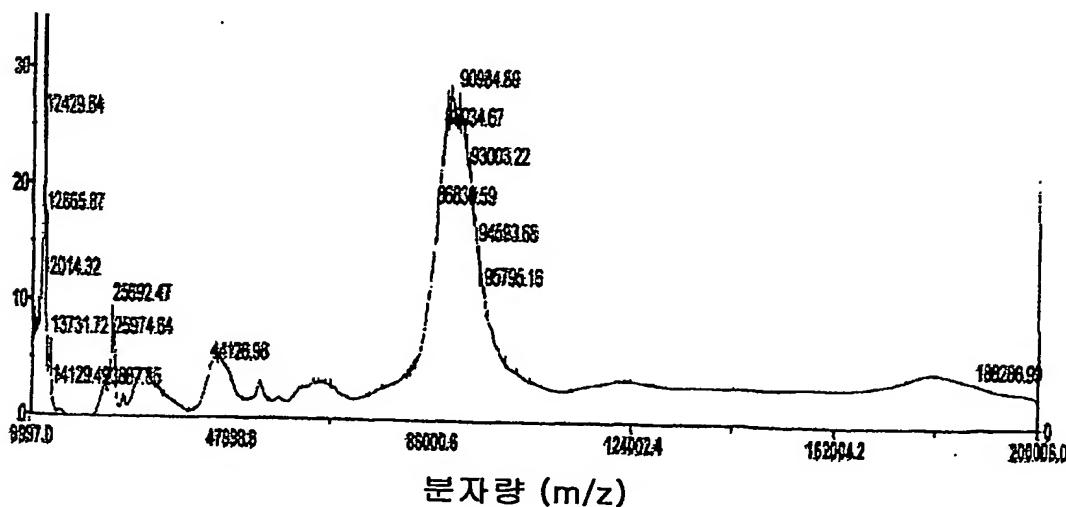
【도 3】



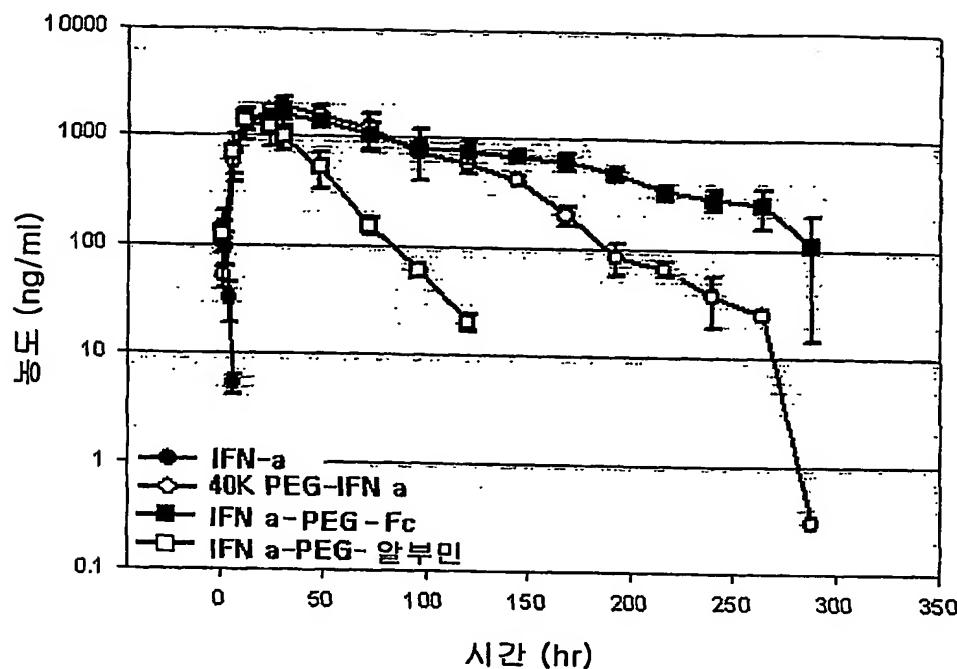
【도 4】



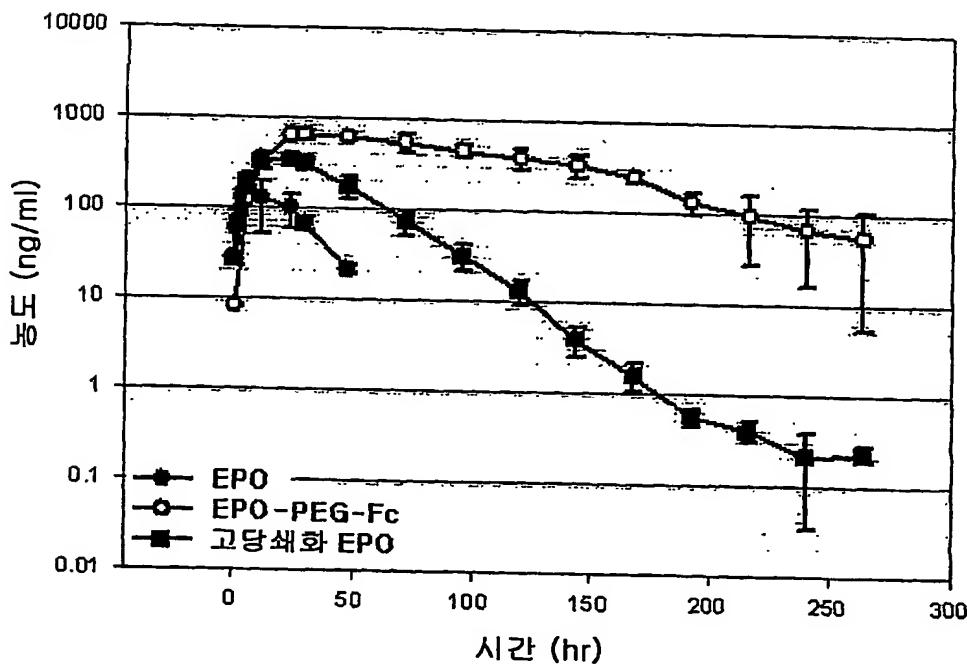
【도 5】



【도 6】



【도 7】



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002944

International filing date: 13 November 2004 (13.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0080299
Filing date: 13 November 2003 (13.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 25 January 2005 (25.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.